
INTERÉS CLÍNICO

La infección con el virus de la Hepatitis B (VHB) se acompaña generalmente de la aparición en el suero de su antígeno de superficie (HBsAg). Este marcador no es exclusivo de la fase aguda de la enfermedad, ya que puede persistir durante años en los portadores asintomáticos y en otras hepatopatías crónicas (1-5).

Desde el descubrimiento del HBsAg y su relación con la infección por VHB, cobró gran importancia el problema de su detección, por lo que constituye un objetivo principal el desarrollo de ensayos cada vez más sensibles para el diagnóstico de dicho marcador. El uso del sistema amplificador estreptavidina / biotina se ha convertido rápidamente en una importante herramienta para lograr estos fines, ya que eleva la sensibilidad de los ensayos inmunoenzimáticos.

El UMELISA HBsAg PLUS es un ensayo inmunoenzimático tipo sandwich, para la detección del antígeno de superficie del VHB en suero, plasma o sangre seca sobre papel de filtro.

El uso terapéutico de sangre o sus derivados, el contacto sexual, accidentes con material contaminado y la infección perinatal, son las principales vías de transmisión de esta enfermedad (6-10). Es por ello que la determinación del HBsAg es de esencial importancia en:

- 1-El pesquiasaje de donantes de sangre.
- 2-El control de grupos de riesgo.
- 3-El pesquiasaje de embarazadas.
- 4-El estudio de pacientes con hepatopatías.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA HBsAg PLUS es un análisis inmunoenzimático heterogéneo tipo "sandwich" que emplea las ventajas de la reacción de alta afinidad entre la Estreptavidina y la Biotina.

En este ensayo se utilizan como fase sólida tiras con ocho pocillos revestidos con anticuerpos monoclonales murinos de alta afinidad dirigidos contra el HBsAg.

Las muestras se incuban en los pocillos de las tiras y los anticuerpos en su superficie capturan el HBsAg si éste se encuentra presente. A continuación, previo lavado que elimina los componentes de la muestra no fijados, se añaden anticuerpos monoclonales biotinilados específicos al HBsAg (Anticuerpos Biotinilados), que se unirán al complejo formado sobre la fase sólida. Una vez eliminados los Anticuerpos

Biotinilados en exceso, se añade el conjugado Estreptavidina / Fosfatasa Alcalina (F.A.) y luego de un paso de incubación y lavado, se adiciona el sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil fosfato), que será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de HBsAg en la muestra.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO
Código UM 2031 (288 pruebas) Código UM 2131 (480 pruebas)

Contenido:	UM 2031	UM 2131
Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3	5
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL	2 x 25 mL
R2: Control Negativo	1 x 1 mL	1 x 1 mL
R3: Control Positivo	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
R4: Anticuerpos Biotinilados	1 x 7,5 mL	1 x 7,5 mL
R5: Conjugado	1 x 7,5 mL	1 x 7,5 mL
R6: Sustrato	1 x 2 mL	1 x 2 mL
R7: Tampón Sustrato	1 x 18 mL	1 x 18 MI

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.

(*)EL R3 contiene $8 \pm 0,5$ Unidades Internacionales/mL (UI/mL) de HBsAg subtipo ad inactivado por tratamiento termoquímico, calibrado frente a la preparación de referencia de la OMS.

Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante. Los controles resultaron ser negativos a las pruebas de detección de Anti-HIV 1+2 y Anti-HCV.

Preparación de las soluciones de trabajo:

R1: Para una tira de reacción, diluya 1 mL de solución R1 hasta 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare solamente lo necesario para el ensayo.

R2: Listo para el uso.

R3: Listo para el uso.

R4: Listo para el uso. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL.

R5: Listo para el uso. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL.

R6: Diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R6 + 0,45 mL de R7). Prepare inmediatamente antes de usar y solamente lo necesario para el ensayo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

-Todos los reactivos deben mantenerse de 2 a 8 °C. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

- Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante 2 meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento.

- Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante 2 meses de 2 a 8 °C en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Papel absorbente.
- Hipoclorito de Sodio.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 μ L.
- Pipetas de precisión entre 10 y 1000 μ L.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.
- Incubadora de 37 ± 1 °C.

PRECAUCIONES

- Las muestras de suero o plasma a utilizar deben ser preferentemente frescas, sin precipitados, coágulos o células sanguíneas, por lo que deben extraerse los materiales insolubles por centrifugación antes de realizar la prueba. Se recomienda evitar la reiterada congelación y descongelación de las muestras, todo lo cual puede ser causa de resultados alterados.
- Las muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro **S & S 903**, almacenadas de 2 a 8 °C o a -20 °C, son estables durante 3 meses (11).
- Antes de comenzar a trabajar verifique que todos los reactivos estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente.
- Manipule las muestras y controles como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales contaminados deben colocarse en solución desinfectante (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.
- No realizar la prueba en presencia de vapores reactivos (por ej., hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis o aldehídos).
- Considere los equipos y accesorios que han estado en contacto directo con la muestra como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza que se recomiendan en los manuales de usuario correspondientes.
- Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora.
- Utilice puntas limpias o nuevas para el trabajo con las soluciones y muestras.
- Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.
- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.
- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
- Todas las fases de pipeteo deben llevarse a cabo con sumo cuidado y precisión. Evite salpicaduras que pueden provocar contaminación entre pocillos.
- Sugerimos el uso de pipetas manuales de precisión para la aplicación de las muestras, los controles y demás reactivos de la prueba.
- Si utiliza la multipipeta ERIZO para transferir las muestras, debe lavar profusamente sus puntas con agua destilada y solución de trabajo R1 para evitar la contaminación. Deseche la solución y el agua destilada después de cada lavado.

-
- Deben seguirse cuidadosamente las instrucciones de utilización del equipo de lavado. Los lavados incompletos influyen negativamente en el resultado del ensayo. Se debe tener cuidado de no rayar la superficie interior del pocillo durante la operación de lavado.
 - Evite contaminaciones con materiales fluorescentes.
 - Utilice puntas y accesorios sin restos de agentes químicos susceptibles de desnaturalizar el HBsAg.
 - Tenga el cuidado de utilizar puntas limpias e independientes para aplicar los controles en la placa de reacción, tanto el intercambio de éstas, como de los tapones de estos frascos, puede provocar resultados erróneos en el ensayo.
 - No incorporar a los frascos originales remanentes de reactivos.
 - El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.
 - Los reactivos del **UMELISA HBsAg PLUS** de lotes diferentes no se deben intercambiar.
 - En aquellos laboratorios donde se procesa un número elevado de muestras sospechosas de contener HBsAg, se sugiere la aplicación de los Anticuerpos Biotinilados y el conjugado con puntas independientes; para evitar la contaminación por arrastre de un pocillo a otro.
 - Una muestra reactiva que en las siguientes repeticiones exponga resultados no reactivos, puede indicar que en la primera determinación se produjo contaminación del equipo con una muestra altamente reactiva.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.- Preparación de las muestras y controles.

Los controles se presentan en el estuche listos para usar. La preparación de las muestras varía según se trate de muestras líquidas de suero o plasma, o de muestras de sangre seca sobre papel de filtro.

Procedimiento A: Para muestra de suero o plasma. Las muestras se utilizan sin previa dilución.

Procedimiento B: Para muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro S & S 903. Corte con un perforador para papel dos discos de 3 mm de diámetro en la zona central de la mancha de sangre. Depositelos en un recipiente apropiado y añádale 40 µL de solución R1 de trabajo. Incube una hora a temperatura entre 20 y 25 °C en cámara húmeda. Homogeneice adecuadamente, por ejemplo, golpeando suavemente el lateral del recipiente de elución.

2.- Adición de las muestras y controles a las tiras de reacción.

Coloque 10 µL de las muestras y de los controles sobre los pocillos de reacción, de acuerdo con el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	P	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	N	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	N	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

El Control Positivo (P) y el Control Negativo (N) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión y puntas independientes.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa **UMELISA HBsAg PLUS** para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.-Incubación de las muestras y controles.

Incube las tiras de reacción una hora a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esta temperatura tanto para el procedimiento A, como para el B.

4.-Lavado.

Utilice un lavador de tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción seis veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (25-28 µL). La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

El lavado incompleto influye negativamente en el resultado de la prueba. Se debe tener cuidado de no rayar la superficie interior del pocillo durante la operación de lavado.

5.-Adición de los Anticuerpos Biotinilados.

Con una punta nueva extraiga del frasco de Anticuerpos Biotinilados la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras de reacción utilizadas y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL de Anticuerpos Biotinilados en cada pocillo de la tira reacción.

6.-Incubación de los Anticuerpos Biotinilados.

Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esta temperatura.

7.-Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

8.-Adición del conjugado.

Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras de reacción utilizadas y deposítelo en un recipiente limpio.

Añada 10 μ L del conjugado en cada pocillo de la tira reacción.

9.-Incubación del conjugado.

Incuba las tiras de reacción 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esta temperatura.

10.-Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

11.-Adición del sustrato.

Coloque 10 μ L de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo.

12.-Incubación del sustrato.

Incuba 30 minutos en cámara húmeda a temperatura entre 20 - 25 °C. En estas condiciones se garantiza una señal de fluorescencia del Control Positivo entre 75 y 180 unidades. Sin embargo, debido a las variaciones de temperatura se recomienda que cada laboratorio establezca su propio tiempo de incubación óptimo.

13.-Lectura.

Realice la lectura de la fluorescencia utilizando un lector de la serie SUMA.

La validación, interpretación de los resultados y su impresión, se realizarán automáticamente por el programa **UMELISA HBsAg PLUS** o pueden calcularse manualmente de acuerdo a las instrucciones que se describen a continuación.

CONTROL DE CALIDAD

Las condiciones mínimas requeridas para asegurar la calidad del ensayo son las siguientes:

1- Al menos uno de los duplicados del Control Positivo (**P1** o **P2**) debe tener un valor de fluorescencia entre 75 y 180 unidades.

2- Al menos dos de los duplicados del Control Negativo debe tener un valor de fluorescencia entre 1 y 7 unidades.

El cumplimiento de estos requisitos garantiza la detección de 0,28 UI/mL para el subtipo ad (del VHB), según estándar secundario calibrado frente al patrón internacional de la OMS (IRP 80/549), en muestras de suero o plasma.

En el caso de muestras de sangre seca sobre papel de filtro, el cumplimiento de estas condiciones garantiza la detección de 2 UI/mL de HBsAg, para el subtipo ad del VHB.

NIVEL DE CORTE

Las muestras de suero, plasma y sangre seca sobre papel de filtro se consideran positivas cuando: $(Fi-NN) / (P-NN) \geq 0,03$.

Siendo: **P** = Duplicado del Control Positivo con menor fluorescencia, que se encuentre dentro de los límites de calidad.

NN = Mediana de los Controles Negativos que se encuentren dentro de los límites de calidad.

Fi = Fluorescencia de la muestra.

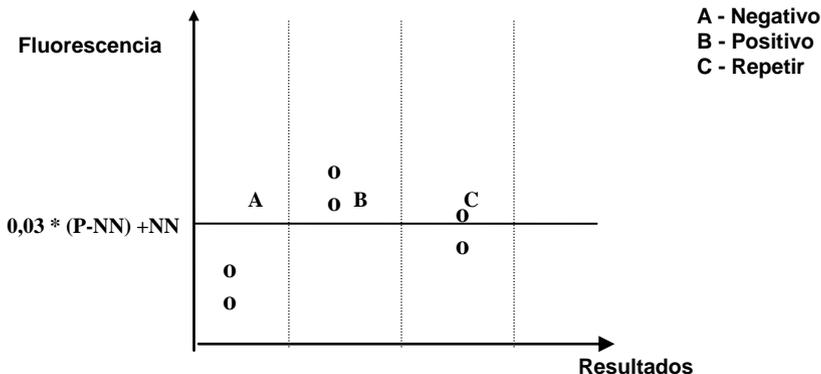
Para definir de una forma rápida el nivel de corte cuando no se dispone del programa automático, se calcula el valor de fluorescencia de la siguiente forma:

$$0,03 * (P-NN) + NN$$

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

I- Muestras analizadas por duplicado:

La interpretación de los resultados se realizará según el siguiente diagrama:



II- Muestras analizadas de forma simple:

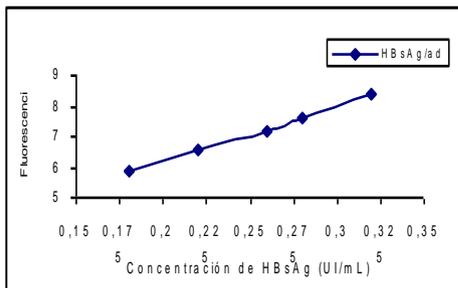
- Las muestras con valores superiores o iguales al nivel de corte son consideradas reactivas (**"POSITIVO"**). Las muestras con resultados inferiores se consideran no reactivas.
- Un resultado repetidamente (**"POSITIVO"**) indica que la muestra contiene HBsAg o un factor inespecífico, por lo que debe confirmarse, para su clasificación definitiva, con los reactivos del HBsAg CONFIRMATORY TEST.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

DETECTABILIDAD

Para muestras de suero o plasma.

Se determinó con una preparación del estándar internacional (IRP) 80/549 de la OMS. La detectabilidad para ese tipo de muestras es de 0,28 UI/mL.



Para muestras de sangre seca sobre papel de filtro

Las pruebas en muestras de sangre seca sobre papel de filtro requieren una dilución de las mismas con el objetivo de extraer el analito de interés, por tal motivo la detectabilidad para este tipo de muestras es de 2 UI/mL.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

Fue calculada utilizando un panel de 1537 muestras de suero procedentes de donantes de sangre sanos y pacientes infectados con HBV, clasificadas por otras técnicas inmunoenzimáticas comerciales.

Los resultados positivos se confirmaron con el HBsAg CONFIRMATORY TEST

Muestra Analizadas	VP	FN	VN	FP	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
1537	275	0	1261	1	100	99,92

VP: Verdaderos Positivos. VN: Verdaderos Negativos.
FP: Falsos Positivos. FN: Falsos Negativos.

PRECISION.

La reproducibilidad del ensayo fue determinada analizando los controles y tres muestras de suero con concentraciones diferentes de HBsAg en replicados de diez, en diez ensayos consecutivos, utilizando el mismo lote de reactivos. Se calcularon los coeficientes de variación intraensayo e interensayo.

Precisión del UMELISA HBsAg PLUS

HBsAg (UPEI/mL)	Interensayo		Intraensayo	
	FI	CV (%)	FI	CV (%)
SCP (3)	97,14	5,28	102,56	4,32
SCN (0)	2,34	13,16	2,52	11,27
M1 (0,1)	5,97	4,07	6,18	3,30
M2 (0,4)	18,65	5,01	19,51	5,39
M3 (0,8)	37,86	3,60	39,03	3,34

FI: Unidades de Fluorescencia CV: Coeficiente de Variación

BIBLIOGRAFÍA

- 1-Blumberg, B.S.et al.: A serum antigen (Australian antigen) in Down's Syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 66:924, 1967.
- 2-Benhamov, J.P.: Viral Hepatitis an overview (A,B,C,D,E). En: *Viral Hepatitis Management. Standards for the future. Abstract & Posters. Cannes, 1992.* p.6.
- 3-Perrillo, R.P.: Hepatitis B: Transmission and Natural History. En: *Viral Hepatitis Management. Standards for the future. Abstract & Posters. Cannes, 1992.* p.15.
- 4-Chang, M.H.et al.: Hepatitis B virus integration in hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma in childhood. *Hepatology.* 13:316, 1991.
- 5-Trepo, C.: Diagnostic Markers of Viral Hepatitis B and C. En: *Viral Hepatitis Management. Standards for the future. Abstract & Posters. Cannes, 1992.* p.21.
- 6-Margolis, H.S.et al.: Hepatitis B: Evolving epidemiology and implications for control. *Sem. Liver Dis.* 11:84-92, 1991.
- 7-Alter, M.J.et al.: Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. *JAMA* 262:1201, 1989.
- 8-Ko, Y.C. et al.: Horizontal transmission of hepatitis B virus from siblings and intramuscular infection among preschool children in a familiar cohort. *Am. J. Epidemiol.* 133:1015, 1991.
- 9-Piot, P. et al.: Hepatitis B: transmission by sexual contact and needle sharing. *Vaccine.* 8:837, 1990.
- 10-Summers, P.R. et al.: The pregnant Hepatitis B carrier: evidence favoring comprehensive antepartum screening. *Obstet. Gynecol.* 69:701, 1987.
- 11- Elves, L.H., Loeber, J.G., The need for standardized bloodspot TSH-calibrators in congenital hypothyroidism screening. *Early Human Development* 45: 179-190, 1996.

Abril 20, 2006

UMELISA HBsAg PLUS

Códigos UM 2031 y UM 2131

Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653, La Habana, CUBA.

Teléfono: 208-2929. Fax: (537) 208-6514.